棉铃虫普通气味受体基因 *HarmOR9* 和 *HarmOR29* 的克隆和组织表达分析

刘宁灿[1,2]，张　进[2]，王桂荣[2]，刘　杨[2,*]，严善春[1,*]

（1. 东北林业大学林学院，哈尔滨 150040；2. 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193）

摘要：【目的】对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 2 个普通气味受体基因的 cDNA 全长进行分析，明确这两个普通气味受体基因在不同组织中的表达分布，为进一步的功能研究奠定基础。【方法】利用 PCR 结合 RACE 技术克隆棉铃虫两条普通气味受体基因的 cDNA 全长；利用不同的生物信息学软件对序列进行结构预测、序列比对和进化树分析；利用半定量 RT-PCR 检测其在棉铃虫成虫不同组织中的表达。【结果】获得两条棉铃虫气味受体基因的全长序列，并命名为 *HarmOR9* 和 *HarmOR29*（GenBank 登录号分别为 KJ188252 和 KJ188253）。序列分析显示，*HarmOR9* 全长 1 206 bp，编码 401 个氨基酸；*HarmOR29* 全长 1 188 bp，编码 395 个氨基酸。选择已报道的鳞翅目昆虫烟青虫 *Heliothis assulta*、家蚕 *Bombyx mori*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 和棉铃虫的气味受体与本实验克隆得到的两个气味受体基因的编码产物进行序列比对和进化树分析，结果显示这两个气味受体与性信息素受体区别明显，并与其他普通气味受体聚类在一起。半定量 RT-PCR 的结果显示 *HarmOR9* 与 *HarmOR29* 都主要在触角中高表达且无雌雄间差异，*HarmOR29* 在其他组织中均不表达；而 *HarmOR9* 在雄虫下唇须中有微量表达，在其他组织中均不表达。【结论】本研究从棉铃虫中克隆得到 2 个气味受体基因 *HarmOR9* 和 *HarmOR29* 的 cDNA 全长，其编码产物具有气味受体的典型特征并且属于普通气味受体。明确了这两个气味受体基因都在棉铃虫成虫的触角中高表达，且无雌雄差异，推测其可能参与了棉铃虫普通气味的识别过程。

关键词：棉铃虫；嗅觉受体；基因克隆；组织表达谱；半定量 RT-PCR

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2014)05-0522-08

Cloning and tissue expression analysis of general odorant receptor genes *HarmOR9* and *HarmOR29* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

LIU Ning-Can[1], ZHANG Jin[2], WANG Gui-Rong[2], LIU Yang[2,*], YAN Shan-Chun[1,*] (1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory of Plant Disease and Insect Pests, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Aim】This study aims to clone two general odorant receptor genes, analyze their sequences and investigate their expression profiles in different tissues of adults of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. The findings will provide basic knowledge for further functional study of these two odorant receptor genes. 【Method】We cloned the full-length cDNA sequences of two odorant receptor genes by PCR and RACE techniques. The structure prediction, sequence alignment and phylogenetic analysis of the coding products of these two odorant receptor genes were performed using different bioinformatics softwares. The expression profiles of these two genes in different tissues were investigated by using semi-quantitative RT-PCR. 【Results】Two full-length cDNA sequences encoding odorant receptors were obtained and named as *HarmOR9* and *HarmOR29* (GenBank accession number KJ188252 and KJ188253, respectively). Sequence analysis showed that the full-length of *HarmOR9* gene is 1 206 bp, which encodes a polypeptide of 401 amino acids, and the full-length of *HarmOR29* gene is 1 188 bp, which encodes a polypeptide of 395 amino acids. Sequence alignment and phylogenetic analysis of the coding products of these two odorant receptor genes with reported odorant receptors from lepidopteran

基金项目：国家自然科学基金重点项目(31230062)；国家自然科学基金青年基金项目(31201578)；北京市自然科学基金项目(6132028)

作者简介：刘宁灿，女，1988 年生，黑龙江哈尔滨人，硕士研究生，研究方向为昆虫化学生态，E-mail: baibai0619@qq.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: yanshanchun@126.com; yangliu@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2014-03-06；接受日期 Accepted: 2014-04-13

insects including *Helicoverpa assulta*, *Bombyx mori*, *Heliothis virescens* and *H. armigera* showed that the coding products of these two odorant receptor genes are obviously different from sex pheromone receptors, but cluster together with other general odorant receptors. The results of semi-quantitative PCR showed that these two odorant receptor genes were highly expressed in antennae with no significant difference between male and female, *HarmOR*29 was not expressed in other tissues, and *HarmOR*9 was slightly expressed in male labial palps but not in other tissues. 【Conclusion】In this study, two odorant receptor genes were cloned in *H. armigera*. Sequence analysis showed that the coding products of these two genes own typical characteristics of odorant receptors and belong to general odorant receptors. The two odorant receptor genes were highly expressed in adult antennae, with no difference between male and female. Based on the findings, we infer that they may be involved in the identification of general odors.

Key words: *Helicoverpa armigera*; odorant receptor; gene cloning; tissue expression profile; semi-quantitative RT-PCR

嗅觉在昆虫进行寄主选择、觅食、繁殖及躲避天敌等行为方面起着重要作用(Bruce *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2008)。昆虫主要靠其触角上的嗅觉感受器来感受外界的气味分子,触角感受器由触角表皮细胞特化而成,它们与神经系统相连接,能够有效识别来自环境中不同的气味分子,从而对昆虫的生理以及行为反应进行有效的调节。昆虫嗅觉识别是一个及其复杂的过程,该过程有昆虫触角感器中的多种蛋白参与,这些蛋白包括:气味受体(odorant receptors, ORs)、促离子型受体(inotropic receptors, IRs)、气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)、感觉神经元膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMPs)和气味降解酶(odor degrading enzymes, ODEs)等。气味分子从昆虫体外到达嗅觉受体神经元所涉及的相互作用,因发生在嗅觉神经树突的外周空间,被称为气味感受的周缘神经过程(Perireceptor events)(Pelosi, 1996; Pelosi *et al.*, 2006)。该过程可以概括为:外界气味分子通过嗅觉感器表皮上的微孔进入亲水性淋巴液中,与气味结合蛋白结合后被运往嗅觉受体神经元(olfactory receptor neurons, ORNs)树突,气味分子与位于树突上的气味受体进一步反应,进而产生动作电位,激活大脑中的二级神经元,最终指导昆虫行为(Leal, 2013)。在此识别机制中,气味结合蛋白识别和结合外界气味分子是昆虫感受外界气味分子的第一步生化反应(Feng and Prestwich, 1997)。昆虫对结构各异的气味分子进行识别时,不仅依靠气味结合蛋白的初步过滤与识别作用,主要还依赖由嗅觉受体介导的气味分子与嗅觉神经的专一性结合(Clyne *et al.*, 1999; Vosshall *et al.*, 1999; Zwiebel and Takken, 2004)。研究证实,昆虫的嗅觉受体是一个具有 7 次跨膜结构的蛋白,类似于脊椎动物的 G 蛋白偶联受体,但其 N 末端在细胞膜内侧,C 末端在细胞膜外侧,这与 G 蛋白偶联受体的结构恰好相反(Benton, 2006; Lundin *et al.*, 2007)。昆虫的嗅觉传递机制与传统的 G 蛋白模式不同,其有一个独特的离子门传递途径,非选择性地允许大部分甚至所有阳离子通过(Sato *et al.*, 2008a; Wicher *et al.*, 2008)。昆虫气味受体一般分为两种类型:第一种为在不同昆虫中保守且广泛表达的非典型受体(olfactory receptor co-receptor, Orco);第二种为在不同昆虫间高度特异的传统气味受体(ORx)(Mombaerts, 1999; Benton *et al.*, 2006)。气味受体在昆虫的嗅觉识别中具有两个重要的功能:一个是特异性地识别某种或某类气味分子;一个是将化学信号转为电信号,然后将信号从外周神经运送至中枢神经脑部触角叶,继而引发下游行为反应,可以看出在嗅觉识别机制中气味受体处于核心地位。对昆虫嗅觉分子机理的研究将有助于开发基于嗅觉的驱虫剂、引诱剂等来控制害虫的数量,这为棉铃虫的防治带来了一个新的思路(Sato *et al.*, 2008b; Sato and Touhara, 2009)。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 属鳞翅目夜蛾科,是棉花蕾铃期的重要钻蛀性害虫,主要蛀食蕾、花、铃,也取食嫩叶。近年来,随着各种作物的复种指数不断提高,为棉铃虫的发生提供了丰富的食料和有利的繁殖场所,部分地区棉铃虫暴发成灾,加上昆虫抗药性的增强,导致棉铃虫的危害有逐年加重的趋势。因此,寻找新的技术手段成为综合防治棉铃虫的首要问题,很多学者已经将棉铃虫嗅觉作为研究的重点。目前棉铃虫触角转录组测序工作已经完成,并且通过体外表达系统研究了性信息素受体(pheromone receptors, PRs)的功能(Liu *et al.*,

2012, 2013),但对普通气味受体的功能却知之甚少。本研究克隆了两条棉铃虫普通气味受体基因,并且通过 RT-PCR 方法分析了其在不同组织的表达情况,为下一步研究普通气味受体的功能奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和组织收集

棉铃虫为本实验室用人工饲料饲养,饲养温度为 27 ±1℃,相对湿度为 65% ±5%,光周期为 14L: 10D。分别选取羽化后 1 -3 d 的雌、雄成虫,取其触角、喙、下唇须、头(去除触角、喙和下唇须等附器)、生殖器(包括精巢和卵巢)、胸、腹、足、翅等组织,立即用液氮冷冻后置于 -70℃ 冰箱备用。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

使用 Trizol 试剂(Invitrogen, 美国)提取 1.1 节中收集的棉铃虫成虫不同组织的总 RNA,详细操作参照 Trizol 试剂说明书进行。提取的总 RNA 质量和浓度通过琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop-2000 (NanoDrop products, 美国)检测。以总 RNA 为模板,以 Oligo-dT 为引物,按照 First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas, 立陶宛)使用手册,合成 cDNA 第一链,作为 PCR 和半定量 RT-PCR 的模板。

1.3 引物设计

在实验前期的转录组测序和分析工作中,已从棉铃虫的触角中鉴定到了 47 个气味受体基因,最终拼接出 OR 基因可能的序列。我们选择其中的 *HarmOR*9 和 *HarmOR*29 进行克隆和进一步研究。转录组中的 *HarmOR*9 片段长 764 bp,开放阅读框完整,具有完整的 5′端序列,但 3′端不完整。*HarmOR*29 片段长 1 619 bp,包含长度为 1 185 bp 的完整开放阅读框(Liu *et al*., 2012)。首先设计 3′ RACE 引物克隆 *HarmOR*9 的 3′序列以获得完整的开放阅读框。然后设计特异引物,扩增这两条棉铃虫 OR 基因的全长序列。根据克隆得到的基因序列全长,设计特异引物用于半定量 RT-PCR,选择 *β-actin* 为内参基因。实验中的引物全部使用 Primer Premier 5 软件设计,详细信息见表 1。

1.4 基因克隆

首先利用 RACE (rapid-amplification of cDNA ends)技术扩增 *HarmOR*9 的 3′序列,实验操作参照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit(Clontech,美国)操作手册进行,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶检测后用琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)进行回收,回收片段连接 pEASY-T3 克隆载体(全式金生物技术有限公司,北京),送上海生物工程公司测序。获得全长序列后,以棉铃虫成虫触角 cDNA 为模板,利用特异引物扩增 *HarmOR*9 和 *HarmOR*29 的全长序列。PCR 反应体系为: 5 × Prime Star Buffer 5 μL,dNTPs(2.5 mmol/L)2 μL,灭菌水 15.75 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,Prime Star DNA 聚合酶(TaKaRa, 日本)0.25 μL,cDNA 模板 1 μL。反应条件:94℃变性 3 min; 94℃ 10 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min 20 s,35 个循环; 72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶检测并回收,回收片段连接 pEASY-Blunt 克隆载体(全式金生物技术有限公司,北京),送测序。

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列((5′-3′) Primer sequences	引物用途 Use of primers
HarmOR9-3Race	GGTTTGTTAATGTTCGCTTTGGCC	RACE
HarmOR9-F	ATGCTCGAGCAATTTGATAGAT	cDNA 克隆 cDNA cloning
HarmOR9-R	TCACTCAGGGTGATACATAGTTTTC	
HarmOR29-F	ATGGGTTACCAACAAATCG	
HarmOR29-R	TCAACGAGATTGCATGTGACGCA	
HarmOR9-RTF	GTGCTCTGGGTTTTAGAAGCCGTC	半定量 RT-PCR Semi-quantitative RT-PCR
HarmOR9-RTR	GGCATTTCCAACTTAACTTCATCGG	
HarmOR29-RTF	TACAGTAAATGTGTGCCTCCCGTTG	
HarmOR29-RTR	CCAATACGGCATTCTGATCGTCAAT	
HarmActin-RTF	GCCAACAGGGAGAAGATGA	
HarmActin-RTR	ACCAGAGGCGTACAGAGA	

1.5 序列分析

使用 EXPASY(Expert Protein Analysis System, http://www.expasy.org)的 Translate 在线工具进行核苷酸序列翻译。获得的氨基酸序列通过 EXPASY 的 Compute pI/Mw 工具(http://web.expasy.org/compute_pi/)预测蛋白的分子量和等电点。跨膜结构域预测使用 TMHMM 软件(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)。多序列比对通过 DNAMAN 软件完成。使用 MAFFT 软件(http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/)将克隆得到的气味受体与已报道的鳞翅目烟青虫 *Helicoverpa assulta* (Zhang *et al*., 2010; Jiang *et al*., 2014)、家蚕 *Bombyx mori* (Tanaka *et al*., 2009)、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (Krieger *et al*., 2004)和棉铃虫(Liu *et al*., 2012)的气味受体进行氨基酸序列比对,利用 FastTree 软件(Price *et al*., 2010)以最大似然法(maximum

likelihood）构建系统进化树。

1.6　半定量 RT-PCR

以羽化后 1 – 3 d 的雌雄虫触角、下唇须、喙、头（去除触角、喙和下唇须）、足、翅、胸、腹和生殖器的 cDNA 为模板，利用半定量 RT-PCR 检测 *HarmOR9* 和 *HarmOR29* 在以上组织中的表达情况，选择 *β-actin* 作为内参基因。反应体系为：2 × Taq MasterMix PCR 混合液（康为世纪，北京）10 μL，灭菌水 8 μL，上、下游引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，cDNA 模板 1 μL。PCR 反应条件如下：94℃ 变性 3 min；94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，目标基因 33 个循环，内参基因 27 个循环；72℃ 延伸 10 min。取 10 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，胶浓度 2%。凝胶经 EB 染色后，在紫外下用 GelDoc XR 凝胶成像系统（Bio-Rad，美国）成像。用 Image Lab 软件（Bio-Rad，美国）从电泳照片上对目的条带进行吸光强度读数，然后计算出目标基因与 β-actin 条带读数的比值。实验用 3 次独立样品重复 3 次。根据 3 次独立实验的比值，算出平均值及误差线，建立柱状图。

2　结果

2.1　棉铃虫气味受体基因 *HarmOR9* 和 *HarmOR29* 克隆和序列分析

本研究中克隆得到棉铃虫两个气味受体基因的 cDNA 全长，分别命名为 *HarmOR9* 和 *HarmOR29*，GenBank 数据库登录号分别为 KJ188252 和 KJ188253。序列分析显示，*HarmOR9* 全长 1 206 bp，编码 401 个氨基酸，预测的蛋白分子量为 46.75 kDa，等电点 8.93。利用 TMHMM 2.0 蛋白跨膜结构域预测软件分析，*HarmOR9* 具有 6 个跨膜结构域，分别位于第 41 – 63，73 – 95，145 – 167，204 – 226，275 – 297 和 301 – 323 位氨基酸残基，N 末端位于细胞膜内（图 1：A）。*HarmOR29* 全长 1 188 bp，编码 395 个氨基酸，预测的蛋白分子量为 45.99 kDa，等电点 8.93。TMHMM 2.0 软件预测 *HarmOR29* 具有 7 个跨膜结构域，跨膜区氨基酸的位置分别是第 36 – 58，68 – 87，130 – 152，183 – 205，270 – 292，297 – 319 和 367 – 389 位，N 末端也位于细胞膜内（图 1：B）。

2.2　HarmOR9 和 HarmOR29 序列比对和进化树分析

为明确新克隆的两条气味受体基因的编码产物与其他鳞翅目昆虫气味受体之间的关系，我们将

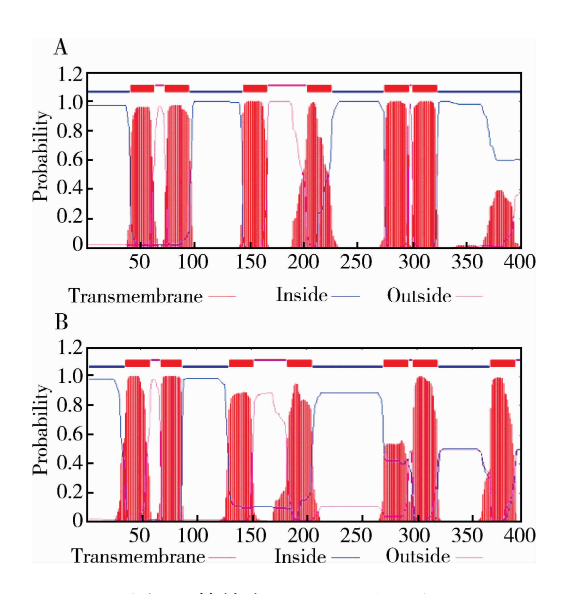


图 1　棉铃虫 HarmOR9（A）和 HarmOR29（B）的跨膜结构域预测

Fig. 1　Transmembrane domain prediction of HarmOR9 (A) and HarmOR29 (B) from *Helicoverpa armigera*

HarmOR9 和 HarmOR29 与其他昆虫气味受体进行了氨基酸序列比对和进化树分析。序列比对结果显示，HarmOR9 与烟青虫 HassOR9 的序列一致性最高，达 94.3%，其次是与烟芽夜蛾 HvirOR9，一致性达 88.3%（图 2）。HarmOR29 与已知的昆虫气味受体的一致性都较低，与其一致性最高的是家蚕 BmorOR13，只有 48.2%，与烟芽夜蛾 HvirOR8 的一致性也只有 44.1%（图 2）。

系统进化树显示，鳞翅目昆虫不同气味受体中，非典型气味受体和性信息素受体由于较高的同源性，在进化树中可以分别聚成一支。普通气味受体与非典型气味受体和性信息素受体有明显的分离（图 3）。从图中我们可以看出，HarmOR9 先与 HassOR9 聚合，之后与 HvirOR9 聚合，然后再与 BmorOR25 聚合，这 4 个蛋白聚为一支；HarmOR8 和 HvirOR8 首先聚合，再与 HarmOR29 聚合，最后与 BmorOR13 聚合，这 4 个蛋白聚为一支。二者都与性信息素受体有明显分离，证明它们都属于普通气味受体（图 3）。

2.3　*HarmOR9* 和 *HarmOR29* 在棉铃虫成虫不同组织中的表达分析

利用半定量 RT-PCR 的方法检测了 *HarmOR9* 与 *HarmOR29* 在棉铃虫雌雄蛾的触角、下唇须、喙、头（去除触角、下唇须和喙）、足、翅、胸、腹和生殖器等 9 个组织中的表达模式。结果显示：*HarmOR9* 与 *HarmOR29* 均在触角中高表达且无雌雄差异；*HarmOR29*

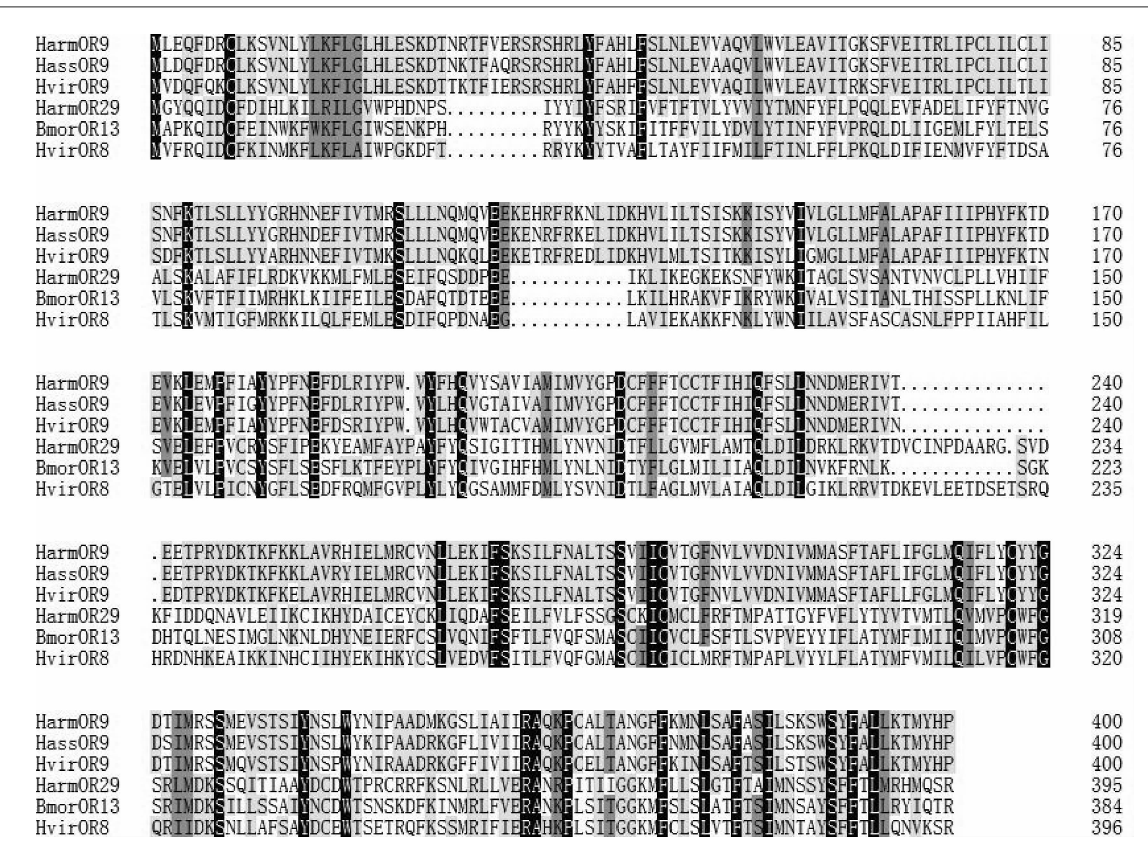


图 2 HarmOR9 和 HarmOR29 与其他昆虫气味受体氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignments of HarmOR9 and HarmOR29 with odorant receptors from other insects

各气味受体的 GenBank 登录号 GenBank accession numbers of odorant receptors：HarmOR9 （KJ188252）；cHassOR9 （JX982541）；HvirOR9 （AJ487484）；HarmOR29 （KJ188253）；BmorOR13 （AB472095）；HvirOR8 （AJ487483）.

在其他组织中均不表达；而 *HarmOR*9 在雄虫下唇须中有微量表达，在其他组织中均不表达（图 4）。

3 讨论

本研究在实验前期转录组测序和分析的基础上，从棉铃虫触角中克隆得到两条气味受体 *HarmOR*9 与 *HarmOR*29 的 cDNA 全长。昆虫的气味受体具有典型的结构特征，即具有 7 个跨膜结构域并且 N 末端位于细胞膜内（Benton *et al*., 2006；Leal, 2013）。氨基酸序列分析的结果显示 HarmOR9 与 HarmOR29 都具有跨膜结构域并且 N 末端位于细胞膜内，其中预测 HarmOR29 具有 7 个跨膜结构域，而 HarmOR9 只有 6 个跨膜结构域。这是由于昆虫的气味受体的三级结构还未解出，对其结构的研究也不够深入，所以对跨膜结构域的预测也不够准确。在对苹果蠹蛾 *Cydia pomonella*（Bengtsson *et al*., 2012）、海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis*（Jacquin-Joly *et al*., 2012）等其他昆虫气味受体的跨膜结构域预测时也得到类似的结果。因此我们可以确定 HarmOR9 与 HarmOR29 符合昆虫气味受体的结构特征。

氨基酸序列比对结果显示 HarmOR9 和 HarmOR29 与已知的气味受体基因，特别是鳞翅目夜蛾科昆虫的气味受体有较高的序列一致性。尤其是 HarmOR9 与烟青虫 HassOR9 的一致性达到了 94.3%，说明它们可能是直系同源基因。HarmOR29 和家蚕 BmorOR13 的序列一致性只有 48.2%，两者是否为同源基因还需进一步研究。系统进化树分析进一步验证了序列比对结果，HarmOR9 与 HassOR9，HarmOR29 与 BmorOR13 及其他相似序列各自聚为一支。系统进化树还显示 HarmOR9 和 HarmOR29 分别与昆虫的性信息受体在遗传关系上有明显的特异性，而与普通气味受体聚在一起，证明它们也属于普通气味受体。

半定量 RT-PCR 结果表明，*HarmOR*9 和 *HarmOR*29 均在雌雄虫触角高表达，*HarmOR*9 在雄虫下唇须中有微量表达，在其他组织均不表达。多个研究的报道指出，部分气味受体在雄性或雌性成虫触角高表达甚至特异表达，部分气味受体则在雌

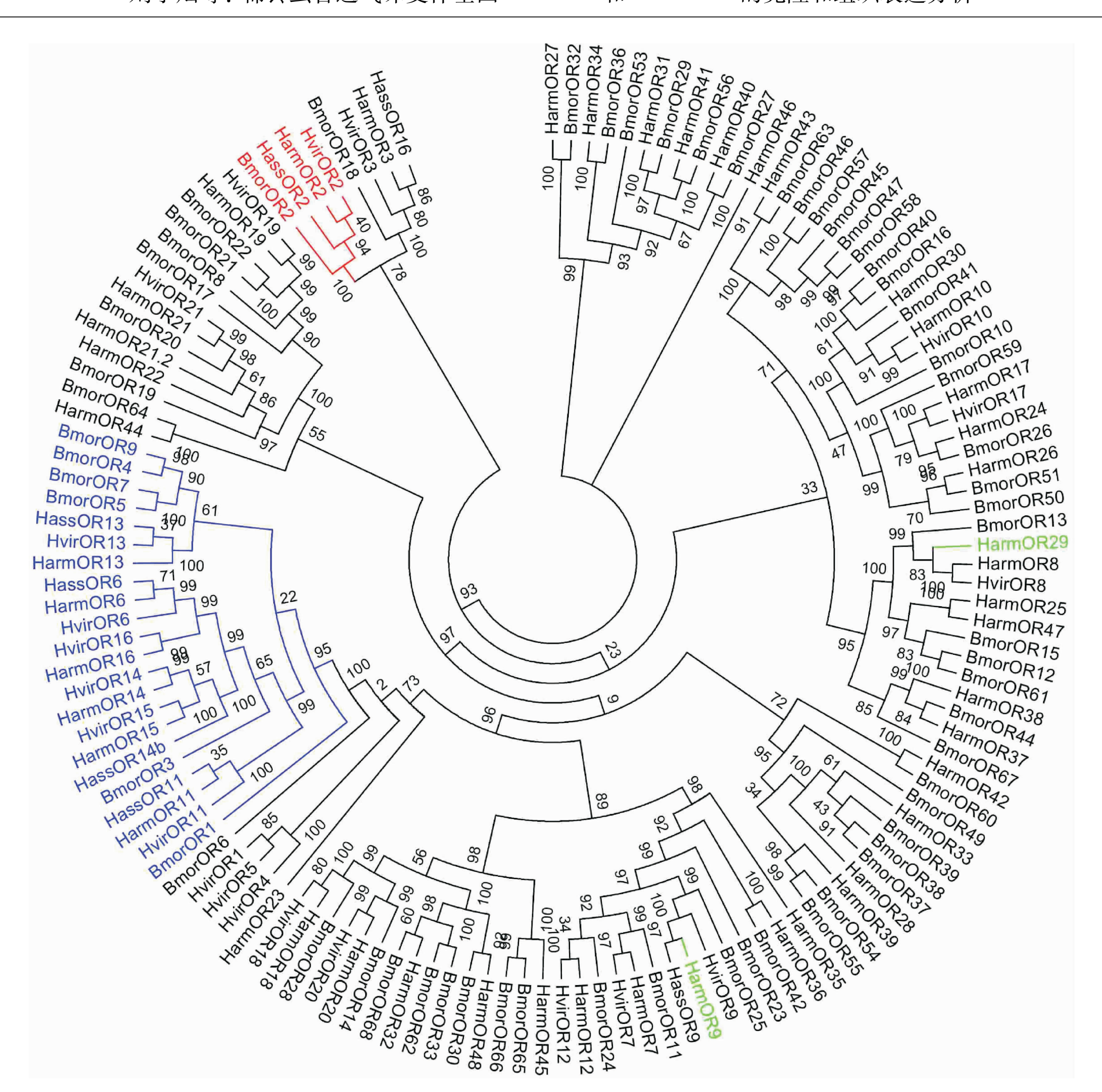


图 3　几种鳞翅目昆虫气味受体的系统进化树

Fig. 3　Phylogenetic tree of odorant receptors (Ors) from several Lepidopteran insects

Harm：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*；Hvir：烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*；Bmor：家蚕 *Bombyx mori*；Hass：烟青虫 *H. assulta*. 棉铃虫的两个气味受体用绿色标出；性信息素受体用蓝色标出；Orcos 用红色标记。The two Ors from *H. armigera* are marked in green, the PRs in blue, and the Orcos in red.

雄成虫触角间无明显差异,另外,还有些在其他组织中有特异表达(Krieger *et al*., 2002; Legeai *et al*., 2011)。由于气味受体是在嗅觉感器神经元内表达,而触角是昆虫最重要的嗅觉器官,其表面存在大量的嗅觉感器(王桂荣等,2002),因此,*HarmOR*9 和 *HarmOR*29 在触角中高表达与其气味受体的功能是一致的。*HarmOR*9 和 *HarmOR*29 在触角中的表达没有雌雄特异性,也验证了它们的编码产物都属于普通气味受体,不参与性信息的识别过程。下唇须属于嗅觉附器,其中也有嗅觉感器的存在(Goldman *et al*., 2005),并且有研究指出气味受体基因在下唇须中有微量表达(Forstner *et al*., 2009),因此,*HarmOR*9 在雄虫下唇须的表达也可以理解。由于昆虫普通气味受体的功能分化很大,因此不同的普通气味受体具有不同的表达模式并执行不同的功能。对家蚕的 66 个气味受体的研究就显示,不同气味受体在不同发育阶段和嗅觉附器中的表达有明显差异,并且具有不同的功能(Tanaka *et al*., 2009)。除了对模式昆虫果蝇等气味受体进行了系统的研究之外,近几年人们对昆虫尤其是鳞翅目昆虫的性信息素受体的研究也非常重视,已经在棉铃虫(Liu *et al*., 2013)、海灰翅夜蛾(Montagné *et al*., 2012)、烟芽夜蛾(Wang *et al*., 2011)等多种鳞翅目昆虫中克隆了数量不等的性信息素受体基因并进行了功能研究,这些性信息素受体可以被其各自的性信息素成分激活,参与了交配过程中雄蛾对雌蛾的识别。然而,对昆虫普通气味受体的功能研究却鲜有报道,只有苹浅褐卷蛾 *Epiphyas postvittana* (Jordan *et al*.,

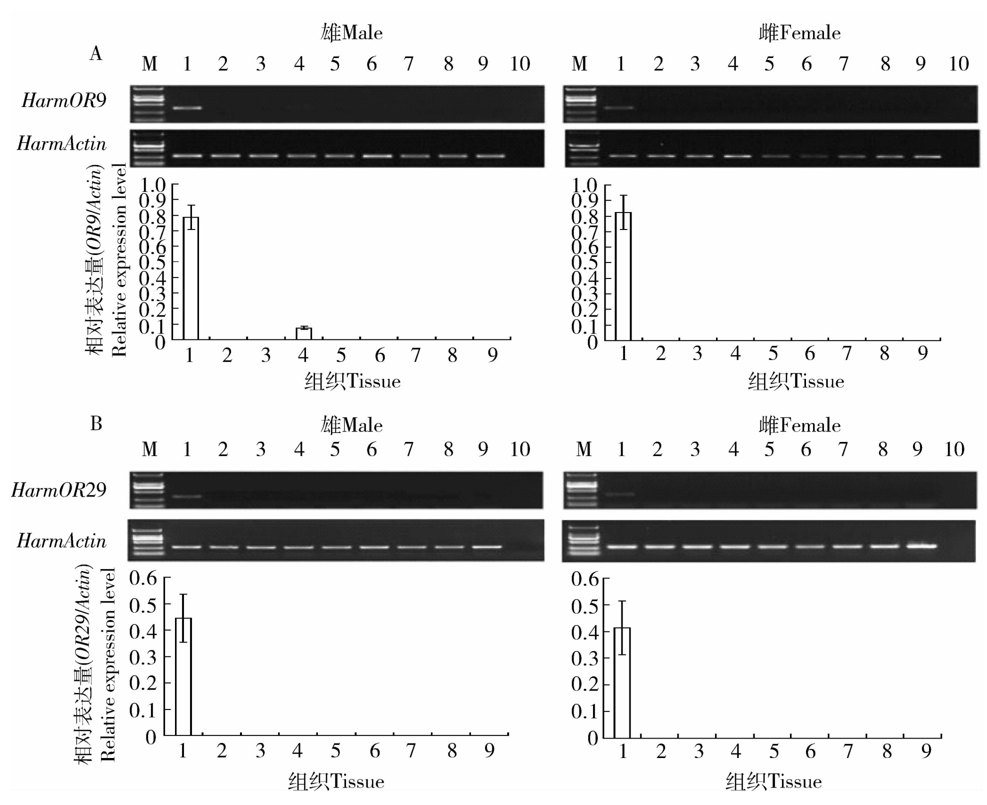


图 4 *HarmOR9*(A)和 *HarmOR29*(B)在棉铃虫成虫不同组织中的表达模式

Fig. 4 Tissue-special expression patterns of *HarmOR9* (A) and *HarmOR29* (B) in adults of *Helicoverpa armigera*

M: D2000 分子量标准物 D2000 marker; 1: 触角 Antennae; 2: 头(除去触角、喙、下唇须等嗅觉附器 Head (without antennae, proboscis and maxillary palps); 3: 喙 Proboscis; 4: 下唇须 Maxillary palps; 5: 足 Legs; 6: 翅 Wings; 7: 胸 Thorax; 8: 腹部 Abdomen; 9: 生殖器 Genitalia; 10: 阴性对照(无 cDNA 模板)Negative control (without cDNA template). 以 *Actin* 的表达量为基准。The expression level of *Actin* is set as 1.

2009)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*(Zhang *et al.*, 2013)等昆虫的少数普通气味受体的功能得到了验证。因此,对于普通气味受体的功能研究亟待加强。为了使 *HarmOR9* 和 *HarmOR29* 这两个基因的研究完整,功能鉴定将是下一步的研究重点。

参考文献(References)

Bengtsson JM, Trona F, Montagné N, Anfora G, Ignell R, Witzgall P, Jacquin-Joly E, 2012. Putative chemosensory receptors of the codling moth, *Cydia pomonella*, identified by antennal transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 7(2): e31620.

Benton R, 2006. On the origin of smell: odorant receptors in insects. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63(14): 1579-1585.

Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB, 2006. A typical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol.*, 4(2): e20.

Bruce TJ, Wadhams LJ, Woodcock CM, 2005. Insect host location: a volatile situation. *Trends Plant Sci.*, 10(6): 269-274.

Clyne PJ, Warr CG, Freeman MR, Lessing D, Kim J, Carlson JR, 1999. A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron*, 22(2): 327-338.

Feng L, Prestwich GD, 1997. Expression and characterization of a lepidopteran general odorant binding protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(5): 405-412.

Forstner M, Breer H, Krieger J, 2009. A receptor and binding protein interplay in the detection of a distinct pheromone component in the silkmoth *Antheraea polyphemus*. *Int. J. Biol. Sci.*, 5(7): 745-757.

Goldman AL, Van der Goes van Naters W, Lessing D, Warr CG, Carlson JR, 2005. Coexpression of two functional odor receptors in one neuron. *Neuron*, 45(5): 661-666.

Jacquin-Joly E, Legeai F, Montagné N, Monsempes C, Francois MC, Poulain J, Gavory F, Walker WB 3rd, Hansson BS, Larsson MC, 2012. Candidate chemosensory genes in female antennae of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*. *Int. J. Biol. Sci.*, 8(7): 1036-1050.

Jiang XJ, Guo H, Di C, Yu S, Zhu L, Huang LQ, Wang CZ, 2014. Sequence similarity and functional comparisons of pheromone receptor orthologs in two closely related *Helicoverpa* species. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 48: 63-74.

Jordan MD, Anderson A, Begum D, Carraher C, Authier A, Marshall SD, Kiely A, Gatehouse LN, Greenwood DR, Christie DL, Kralicek AV, Trowell SC, Newcomb RD, 2009. Odorant receptors from the light brown apple moth (*Epiphyas postvittana*) recognize

important volatile compounds produced by plants. *Chem. Senses*, 34 (5): 383 - 394.

Krieger J, Grosse-Wilde E, Gohl T, Dewer YM, Raming K, Breer H, 2004. Genes encoding candidate pheromone receptors in a moth (*Heliothis virescens*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (32): 11845 - 11850.

Krieger J, Raming K, Dewer YME, Bette S, Conzelmann S, Breer H, 2002. A divergent gene family encoding candidate olfactory receptors of the moth *Heliothis virescens*. *Eur. J. Neurosci.*, 16 (4): 619 - 628.

Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 373 - 391.

Legeai F, Malpel S, Montagné N, Monsempes C, Cousserans F, Merlin C, Francois MC, Maïbèche-Coisné M, Gavory F, Poulain J, Jacquin-Joly E, 2011. An expressed sequence tag collection from the male antennae of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*: a resource for olfactory and pheromone detection research. *BMC Genomics*, 12: 86.

Liu Y, Gu S, Zhang Y, Guo Y, Wang G, 2012. Candidate olfaction genes identified within the *Helicoverpa armigera* antennal transcriptome. *PLoS ONE*, 7(10): e48260.

Liu Y, Liu C, Lin K, Wang G, 2013. Functional specificity of sex pheromone receptors in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE*, 8(4): e62094.

Lundin C, Käll L, Kreher SA, Kapp K, Sonnhammer EL, Carlson JR, Von Heijne Gv, Nilsson I, 2007. Membrane topology of the *Drosophila* OR83b odorant receptor. *FEBS Lett.*, 581(29): 5601 - 5604.

Mombaerts P, 1999. Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.*, 22: 487 - 509.

Montagné N, Chertemps T, Brigaud I, François A, François MC, de Fouchier A, Lucas P, Larsson MC, Jacquin-Joly E, 2012. Functional characterization of a sex pheromone receptor in the pest moth *Spodoptera littoralis* by heterologous expression in *Drosophila*. *Eur. J. Neurosci.*, 36(5): 2588 - 2596.

Pelosi P, 1996. Perireceptor events in olfaction. *J. Neurobiol.*, 30(1): 3 - 19.

Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63 (14): 1658 - 1676.

Price MN, Dehal PS, Arkin AP, 2010. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE*, 5 (3): e9490.

Sato K, Pellegrino M, Nakagawa T, Nakagawa T, Vosshall LB, Touhara K, 2008a. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, 452(7190): 1002 - 1006.

Sato K, Touhara K, 2009. Insect olfaction: receptors, signal transduction, and behavior. *Results Probl. Cell. Differ.*, 47: 203 - 220.

Sato T, Hirono J, Hamana H, Ishikawa T, Shimizu A, Takashima I, Kajiwara R, Iijima T, 2008b. Architecture of odor information processing in the olfactory system. *Anat. Sci. Int.*, 83 (4): 195 - 206.

Song HG, Kwon JY, Han HS, Bae YC, Moon C, 2008. First contact to odors: our current knowledge about odorant receptor. *Sensors*, 8 (10): 6303 - 6320.

Tanaka K, Uda Y, Ono Y, Nakagawa T, Suwa M, Yamaoka R, Touhara K, 2009. Highly selective tuning of a silkworm olfactory receptor to a key mulberry leaf volatile. *Curr. Biol.*, 19(11): 881 - 890.

Vosshall LB, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A, Axel R, 1999. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 96(5): 725 - 736.

Wang G, Vásquez GM, Schal C, Zwiebel LJ, Gould F, 2011. Functional characterization of pheromone receptors in the tobacco budworm *Heliothis virescens*. *Insect Mol. Biol.*, 20(1): 125 - 133.

Wang GR, Guo YY, Wu KM, 2002. Observation on the ultrastructures of antennal sensilla in *Helicoverpa armigera*. *Scientia Agricultura Sinica*, 35 (12): 1479 - 1481. [王桂荣, 郭予元, 吴孔明, 2002. 棉铃虫触角感器的超微结构观察. 中国农业科学, 35 (12): 1479 - 1481]

Wicher D, Schäfer R, Bauernfeind R, Stensmyr MC, Heller R, Heinemann SH, Hansson BS, 2008. *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature*, 452(7190): 1007 - 1011.

Zhang DD, Zhu KY, Wang CZ, 2010. Sequencing and characterization of six cDNAs putatively encoding three pairs of pheromone receptors in two sibling species, *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa assulta*. *J. Insect Physiol.*, 56(6): 586 - 593.

Zhang J, Liu CC, Yan SW, Liu Y, Guo MB, Dong SL, Wang GR, 2013. An odorant receptor from the common cutworm (*Spodoptera litura*) exclusively tuned to the important plant volatile *cis*-3-hexenyl acetate. *Insect Mol. Biol.*, 22(4): 424 - 432.

Zwiebel LJ, Takken W, 2004. Olfactory regulation of mosquito-host interactions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(7): 645 - 652.

（责任编辑：赵利辉）